

SZDB/Z

深圳市标准化指导性技术文件

SZDB/Z 132-2015

小反刍兽疫抗体检测 竞争酶联免疫 吸附法

Detection Method of Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for
Peste des petits ruminants

2015-02-27 发布

2015-03-01 实施

深圳市市场监督管理局

发布

目 次

前 言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 原理.....	1
4 缩略语.....	1
5 试剂和材料.....	2
6 主要器械和设备.....	2
7 PPRV 重组 N 蛋白抗原的制备	3
8 PPRV 单克隆抗体的制备	4
9 待测样品的采集和处理	5
10 竞争酶联免疫吸附（C-ELISA）试验.....	6
附录 A.....	8

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准的附录A为规范性附录。

本标准由深圳市检验检疫科学研究院提出。

本标准起草单位：深圳市检验检疫科学研究院、深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心。

本标准主要起草人：阮周曦、曾少灵、唐金明、花群义、吕建强、杨俊兴、曹琛福、卢体康、廖立珊、陈兵、孙洁、叶奕优、黄超华、马春伟、陈淼、程思。

小反刍兽疫抗体检测 竞争酶联免疫吸附法

1 范围

本标准规定了检测小反刍兽疫抗体检测竞争酶联免疫吸附法及其试剂制备方法。

本标准适用于小反刍兽疫抗体检测、监测和流行病学调查。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

SN/T 2123 出入境动物检疫实验样品采集、运输和保存规范

《中国兽药典》第三部附录

3 原理

酶联免疫吸附试验是由酶分子与抗体分子共价结合形成酶标记抗体，此种结合不会改变抗体的免疫学特性，也不影响酶的生物学活性。通过此种酶标记抗体与吸附在固相载体上的抗原发生特异性结合，当加入底物溶液后，底物可在酶作用下使其所含的供氢体由无色的还原型变成有色的氧化型，从而出现显色反应，此种显色反应可通过酶标仪进行定量测定，从而通过底物的显色反应来判定有无相应的免疫反应。本标准竞争酶联免疫吸附试验则是在ELISA板上包被小反刍兽疫病毒重组N蛋白的制备特异性抗原，然后加入待检血清和抗小反刍兽疫病毒N蛋白单克隆抗体，如果待检血清中存在小反刍兽疫病毒N蛋白抗体，就会竞争性地与包被抗原发生反应。如果待检血清中抗体越多，则特异性单克隆抗体与包被抗原结合的就相对少，从而最终的显色反应就浅。因待检血清中抗体的含量与颜色呈反比，所以可通过显色反应酶标仪读数的方式判定待检血清中是否有小反刍兽疫病毒抗体。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PPR：小反刍兽疫。

PPRV：小反刍兽疫病毒。

C-ELISA：竞争酶联免疫吸附试验。

SZDB/Z 132-2015

PPRV-N蛋白：小反刍兽疫病毒核蛋白。

AcNPV：苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒。

sf9 细胞：草地夜蛾卵巢细胞。

pfu：蚀斑形成单位。

r/min：转速单位，转/分。

IMDM：伊思柯夫改良培养液。

SDS-PAGE：十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

PI：抑制百分率。

5 试剂和材料

a) 包被抗原：PPRV重组N蛋白表达抗原。

b) 单克隆抗体：抗PPRV-N蛋白特异性单克隆抗体。

c) 实验动物：10周龄左右SPF级BAL B/c雌鼠。

d) 标准血清：小反刍兽疫标准阳性血清、弱阳性血清、阴性血清，由世界动物卫生组织（OIE）参考实验室或中国农业部指定实验室提供。

e) 待测血清：动物血清56℃灭能30min。

f) 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG（HRP 标记的羊抗鼠 IgG）：按说明书指定的工作浓度稀释使用。

g) 包被液、洗涤液、稀释液、底物液/显色剂、终止液：配制方法见附录 A。

h) 水：符合GB/T 6682分析实验室二级水规格。

i) 可拆96孔酶标板。

6 主要器械和设备

恒温摇床；

真空冻干机；

台式高速离心机；

凝胶成像系统；

CO₂恒温箱；

多波段酶标仪；

洗板机；

超声波破碎仪；

单孔道、多孔道可调微量移液器（1 μ L、50 μ L、100 μ L、1000 μ L）、微量滴头；

紫外分光光度计。

7 PPRV 重组 N 蛋白抗原的制备

7.1 种毒

为携重组昆虫杆状病毒 AcNPV-PPRV-N 株，为携带小反刍兽疫病毒 N 基因的 pFast HTA-PPRV-N 重组质粒转座 DH10Bac，提取杆粒转染 sf9 昆虫细胞获得。由深圳市检验检疫科学研究院构建、鉴定、保管和供应。

7.2 种毒含量测定

7.2.1 用含10%胎牛血清的Grace's培养基重悬sf9昆虫细胞，调整细胞浓度为 5×10^5 个细胞/mL，加入6孔板，每孔2mL细胞悬液，置CO₂恒温培养箱27℃培养24h，用Grace's培养基洗涤细胞2次。

7.2.2 取种毒病毒液，用Grace's培养基由 10^{-1} 开始作10倍系列稀释，取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 病毒液体，各加两孔，每孔1mL，做好标记。培养2h后收取菌液。

7.2.3 6孔培养板置27℃孵育1h，吸取培养板中病毒液弃去，加入40℃水浴的含4%琼脂糖、20%胎牛血清的2x Grace's培养基，置CO₂恒温培养箱27℃培养7d~10d，观察并进行蚀斑计数。

7.2.4 按照病毒滴度=蚀斑数 \times 病毒稀释倍数/每孔体积数mL进行计算；病毒含量应 $\geq 1.0 \times 10^6$ pfu/mL。

7.3 病毒繁殖和培养

7.3.1 将保存的昆虫杆状病毒AcNPV-PPRV-N株种毒，按1:10比例接种于长成单层的sf9昆虫细胞，在2%胎牛血清的Grace's培养基中27℃培养72~96h，待出现80%细胞病变，收获病毒液作为生产用种子病毒。

7.3.2 取生产用种毒按1:10接种于长成单层的sf9昆虫细胞，扩大培养，27℃下培养96~120h后，出现80%细胞病变，收获细胞悬液。

7.4 PPR-N蛋白抗原的纯化

7.4.1 取收获细胞悬液，置-80℃冰箱，反复冻融3次，以25KHz超声波破碎50次，每次20s，间隔30s，8000r/min离心30min，收获上清液。

SZDB/Z 132-2015

7.4.2 在35000r/min超速离心120min,按超速离心前体积的1/100,用灭菌pH7.2的PBS溶解沉淀蛋白,加入硫柳汞至终浓度为0.01%,按0.5 μ g/mL加入leupeptin(亮抑酶肽)蛋白酶抑制剂,按0.5mL/管分装,真空冻干保存。

7.5 PPRV重组N蛋白抗原的检验及贮藏

7.5.1 性状

PPRV重组N蛋白抗原应为白色固体,无臭、无味。

7.5.2 浓度测定

每瓶用PBS复溶为0.5mL液体。用紫外分光光度计测定在OD₂₈₀和OD₂₆₀波长下的光吸收值,按公式 $1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}$ 计算抗原浓度,蛋白质浓度应不低于400 μ g/mL。

7.5.3 效价测定

每瓶PPRV重组N蛋白抗原用去离子水复溶为0.5mL液体后,用pH9.6的碳酸盐缓冲液1:100稀释后包被酶标板,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C作用1h,洗板3次,加入小反刍兽疫单克隆抗体(约1.7ng/孔),37 $^{\circ}$ C作用1h,洗板3次,加入1:5000稀释的H辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG,37 $^{\circ}$ C作用1h。洗板3次,加入底物溶液避光显色10~15min,用1mol/L H₂SO₄终止反应,用酶标仪读数OD₄₅₀值大于或等于1.0。

7.5.4 特异性检验

与5份小反刍兽疫病毒阳性血清进行酶联免疫吸附试验时,应呈阳性反应;与小反刍兽疫病毒阴性血清、牛瘟病毒、犬瘟热病毒、口蹄疫病毒、蓝舌病病毒、羊痘病毒阳性血清各1份进行酶联免疫吸附试验时,应呈阴性反应。

7.5.5 纯净检验

按现行《中国兽药典》进行检验,应无细菌、霉菌、支原体污染。

7.5.6 贮藏与有效期

真空冻干抗原于2~8 $^{\circ}$ C保存,有效期为12个月。

8 PPRV 单克隆抗体的制备

8.1 杂交瘤细胞系

分泌抗小反刍兽疫病毒核蛋白的特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株,由深圳市检验检疫科学研究院构建、鉴定、保管和供应。

8.2 杂交瘤细胞的培养

取冻存的杂交瘤细胞种子细胞，复苏，用含有 20%胎牛血清，1%HT 的 IMDM 培养基进行复壮培养。

8.3 单克隆抗体腹水制备

杂交瘤细胞长成单层后，收集细胞悬液，1000r/min离心10min，去上清，用IMDM无血清培养基重悬浮细胞，调整浓度至约 1×10^6 个细胞/mL。腹腔注射用降脂烷处理过的BAL B/C雌鼠，5d~10d后小鼠腹腔隆起时，采集腹水。

8.4 单克隆抗体纯化

将采集到腹水于4℃ 8000r/min离心，取上清，利用Protein G亲和层析法进行纯化。纯化后，用PBS稀释成1.7mg/mL，加入硫柳汞至终浓度为0.01%，以每管300μL分装。

8.5 单克隆抗体的检验和贮藏

8.5.1 性状

单克隆抗体应为无色透明液体，无臭、无味。

8.5.2 浓度测定

用紫外分光光度计测定在OD₂₈₀和OD₂₆₀波长下的光吸收值，按公式 $1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}$ 计算抗原浓度，单克隆抗体的蛋白浓度应 ≥ 1.5 mg/mL。

8.5.3 效价测定

用昆虫杆状病毒表达的N蛋白按0.8μg~1.0μg/孔包被ELISA板，将单克隆抗体系列稀释后，进行间接ELISA试验，测得OD₄₅₀值与阴性对照OD₄₅₀值的比值大于2.1时的单克隆抗体最大稀释度即为其ELISA效价。该效价应不低于 $1:10^6$ 。

8.5.4 纯度检验

用SDS-PAGE法鉴定单克隆抗体纯度。电泳结果应为两条清晰的带（重链、轻链各一条），而无其他杂带。

8.5.5 无菌检验

按现行《中国兽药典》进行检验，应无细菌、霉菌、支原体污染。

8.5.6 贮藏与有效期

-80℃保存，有效期为12个月。

9 待测样品的采集和处理

采集血液，室温放置1~2 h，以3500r/min离心10min，分离得到血清。血液采集、血清样品保存等操作可按《出入境动物检疫实验样品采集、运输和保存规范》（SN/T 2123）进行。

10 竞争酶联免疫吸附（C-ELISA）试验

10.1 样品制备

试验时，标准阴性血清、弱阳性血清、阳性血清和待测血清均用稀释液作1：5倍稀释。

10.2 操作方法

10.2.1 包被酶标板

用包被液按1：100稀释抗原，包被96孔酶标板，每孔100 μ L，37 $^{\circ}$ C作用1h或4 $^{\circ}$ C包被过夜。

10.2.2 洗板

取出酶标板弃去液体，每孔加洗液300 μ L，洗板，共3次。最后一次倒置拍干。

10.2.3 封闭

每孔加封闭液100 μ L，37 $^{\circ}$ C反应1h。

10.2.4 洗板

按9.2.2操作。

10.2.5 加待测样品和对照血清

每份待检血清加2孔，每孔50 μ L；每板均设标准阴性血清、弱阳性血清和阳性血清及稀释液对照各2孔，每孔50 μ L。加样完毕，均用振荡器充分振荡混匀，记录加样位置。

10.2.6 加单克隆抗体

每孔加入1：15000倍稀释的单克隆抗体50 μ L，37 $^{\circ}$ C反应1h。

10.2.7 洗板

按9.2.2操作。

10.2.8 加酶结合物

每孔加入1：5000倍稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG100 μ L，37 $^{\circ}$ C反应1h。

10.2.9 洗板

按9.2.2操作。

10.2.10 加底物液

每孔加50 μ L底物液，室温（20~25 $^{\circ}$ C）避光反应15min。

10.2.11 加终止液

取出酶标板，每孔快速加入50 μ L终止液。

10.2.12 测定 OD 值

在 15min 之内，用酶标仪在 450nm 波长下测定 OD 值。

10.3 结果判定

10.3.1 计算公式

$$PI = (1 - \text{待测血清样品平均OD}_{450}\text{值} / \text{阴性孔平均OD}_{450}\text{值}) \times 100\%$$

10.3.2 判定标准

当PPRV强阳性对照PI值 $>80\%$ ； $50\% \leq$ PPRV弱阳性对照PI值 $\leq 80\%$ ；PPRV阴性对照PI值 $<30\%$ 时，试验成立。则待检样品可按下表判定，可疑样品需重复实验，结果仍为可疑则判为阳性。

阻断百分率 (%)	结果
$PI \geq 50\%$	阳性
$45\% < PI < 50\%$	可疑
$PI \leq 45\%$	阴性

附录 A
(规范性附录)
溶液配方

A.1 磷酸盐缓冲溶液 (0.01mol/L pH7.4 PBS)

A.1.1 成分

无水磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)	1.44g
无水磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	0.24g
氯化钾 (KCl)	0.2g
氯化钠 (NaCl)	8.00g
蒸馏水	1000mL

A.1.2 制法

称取各组分溶于 800mL 蒸馏水中, 用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4, 最后加蒸馏水定容至 1L 即可。在 $1.034 \times 10^5 \text{Pa}$ 高压 (121°C) 下蒸气灭菌 (至少 20min), 保存存于室温或 4°C 冰箱中。

A.2 包被液 (0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液)

A.2.1 成分

NaHCO_3	2.92g
Na_2CO_3 ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	1.58 (4.28g)
去离子水	1000mL

A.2.2 制法

将各组分充分混均, 完全溶解, 调节 pH 值至 9.6, 用 0.22 μm (0.45 μm) 滤膜过滤除菌, 置于 4°C 冰箱保存。

A.3 洗涤液

A.3.1 成分

NaCl	32g
KH_2PO_4	0.94g
Na_2HPO_4	5.8g
KCl	0.8g
吐温-20	10ml
去离子水	1000ml

A. 3. 2 制法

将各组分充分溶解，加入0.01%硫柳汞，调节pH值至7.2，用0.22 μ m（0.45 μ m）滤膜过滤除菌。使用前用去离子水20倍稀释。

A. 4 稀释液：1%明胶或5%鸡血清PBST

将1g明胶加入洗涤液至100mL，或以鸡血清与洗涤液配成5%使用，即为稀释液。

A. 5 封闭液：5%牛血清白蛋白

将5g牛血清白蛋白(BSA)加洗涤液至100mL，即为封闭液。

A. 6 底物液

A. 6. 1 底物液 I（pH6.0的乙酸—柠檬酸缓冲液）

乙酸钠（A液）：乙酸钠8.2g、水1000mL，溶解后置于4℃冰箱备用；

柠檬酸（B液）：柠檬酸2.1g、水100mL，溶解后置于4℃冰箱备用；

取B液约10mL至A液中调pH值至6.0，置于4℃冰箱备用。

A. 6. 2 底物液 II（TMB溶液）

TMB350mg、甲醇100 mL，加温溶解后于暗盒中存室温，保存于不透光的棕色瓶中，在2℃～7℃保存。

A. 6. 3 底物液配制（临用前配制）

取底物液 I 873mL、底物液 II 27mL，加30% H₂O₂ 630 μ L，充分混合，用0.22 μ m（0.45 μ m）滤膜过滤除菌，装于棕色小瓶，置于4℃冰箱保存。

A. 7 终止液（1mol/L H₂SO₄）

将10.87mL初始浓度为95%～98%的硫酸缓慢加入到89.13mL的去离子水中混匀，即为终止液。
